

氏名	すずき こういちろう 鈴木 功一郎
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博士甲第 4840 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	炎症性腸疾患における $\alpha$ -マンノシダーゼ II の役割の解明
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士 (薬学)) (副査) 教授 三澤 日出巳 (博士 (薬学)) 准教授 齋藤 義正 (博士 (医学))

## 論文内容の要旨

### 【背景】

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は下痢, 血便, 体重減少などの症状を引き起こす消化管の慢性炎症性疾患である. IBD は潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) に大別されるが, これらの疾患はいずれも日本の指定難病に定められている. IBD の発症メカニズムは未だ解明されていないが, 遺伝的に感受性が高い個体に環境要因が加わることで発症すると考えられている. 従って, IBD の発症に寄与する遺伝的要因を明らかにすることは, IBD の発症メカニズムを解明する上で重要と考えられる. 実際, 一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) をマーカーとしたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) により, 複数の IBD の疾患感受性遺伝子が同定されてきた. 人種によって IBD に関連する SNP は異なることが知られているが, これまでの報告は欧米人ゲノムの解析が中心であり本邦患者の解析例は少ない.

グリコシル化は新生タンパク質 (主に膜タンパク質と分泌タンパク質) に糖鎖が付加される翻訳後修飾であり, 糖鎖がアスパラギン残基に付加される *N*-結合型グリコシル化とセリン残基またはスレオニン残基に付加される *O*-結合型グリコシル化に大別される. ヒトのタンパク質の半分以上が糖鎖を持つ糖タンパク質と言われている. 糖鎖の構造はタンパク質の機能や局在, 他の分子との相互作用に影響を与えることが知られているだけでなく, IBD を含む様々な疾患への糖鎖の関与が報告されている.

$\alpha$ -マンノシダーゼ II ( $\alpha$ -MII) は *MAN2A1* (マウスでは *Man2a1*) にコードされる酵素であり, *N*-結合型糖鎖内のマンノース残基を切断する働きを持つ. *N*-結合型糖鎖の形成は, 小胞体において新生タンパク質内の *Asn-X-Ser/Thr* 配列中のアスパラギン残基に前駆体となる多糖が付加されることから始まる. その後, タンパク質はゴルジ体へと運ばれ, 高マンノース型, ハイブリッド型を経て, 複合型の *N*-結合型糖鎖へと成熟していく. この過程で受ける修飾の組み合わせにより分岐の数や糖の構成に違いが生まれ, *N*-結合

型糖鎖は極めて多様な構造を持つようになる。 $\alpha$ -MII はハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖が複合型 *N*-結合型糖鎖へと変換される過程を担う酵素である。 $\alpha$ -MII には *MAN2A2* (マウスでは *Man2a2*) にコードされる  $\alpha$ -マンノシダーゼ IIx ( $\alpha$ -MIIx) という同じ反応を触媒するアイソザイムが存在する。 $\alpha$ -MIIx は  $\alpha$ -MII の欠損を代償できることが知られており、全身で  $\alpha$ -MII を欠損したマウスにおいても、ほとんどの細胞系列では複合型 *N*-結合型糖鎖の形成にはほとんど影響が現れない。これまでに例外として報告されているのは赤血球系細胞と腎細胞のみであり、これらの細胞が  $\alpha$ -MII を欠損すると複合型 *N*-結合型糖鎖の形成が顕著に阻害される。IBD の主要疾患の 1 つである UC の患者では健常人と比較して血清中の複合型 *N*-結合型糖鎖が増加することが報告されている。しかし、複合型 *N*-結合型糖鎖の UC における病態生理学的な役割は分かっていない。

過去に行われた日本の IBD 患者を対象とする GWAS のデータを利用し、糖鎖関連遺伝子における SNP と IBD (UC 及び CD) の相関を調べたところ (日本大学医学部・山崎慶子博士との共同研究), *MAN2A1* の遺伝子領域に UC と相関を示す SNP が分布していた。申請者は、*MAN2A1* の SNP が UC の発症に寄与する新たな遺伝的要因であり、*MAN2A1* にコードされる  $\alpha$ -MII が UC の病態において何らかの重要な役割を果たしているという仮説を立てた。そこで本博士論文研究において申請者は、遺伝子改変マウスと、UC の動物モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium: DSS) 誘導性大腸炎を用いて、その仮説を実験的に検証した。

## 【方法】

### 腸管上皮細胞特異的 $\alpha$ -MII 欠損マウスの作製

*Man2a1* 遺伝子の floxed 変異マウスと *Villin-Cre* トランスジェニックマウスを交配することで作製した。

### DSS 誘導性大腸

2% の DSS をマウスに飲水投与し、大腸炎を誘導した。投与開始後 7 日目に種々の解析を行った。

### 大腸粘膜固有層 (colonic lamina propria: cLP) に存在する細胞の解析・ソーティング

EDTA 処理により大腸組織から上皮を剥離した後、*Liberase* TM または *collagenase* により細胞を分散した。Fc 受容体をブロッキングした後、蛍光標識された抗体で細胞表面抗原を染色した。さらに細胞内抗原を染色する場合には固定・膜透過処理を行った後、細胞内抗原を染色した。染色した細胞の解析は LSR II Flow Cytometer によって、ソーティングは FACS Aria III によって行った。

### その他の実験

大腸上皮細胞のタンパク質はイムノブロットにより、糖鎖はレクチンブロットにより解析した。大腸組織及び単離した細胞における mRNA の発現は qPCR により調べた。大腸の組織学的評価は組織切片を Hematoxylin & Eosin 染色, Alcian blue 染色し行った。腸

内細菌叢はメタ 16S rRNA シークエンシングにより解析した。

## 【結果・考察】

### 腸管上皮細胞特異的 $\alpha$ -MII 欠損 ( $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup>) マウスの作製

上述の通り、 $\alpha$ -MII には  $\alpha$ -MIIx というアイソザイムが存在し、*MAN2A1* と *MAN2A2* にそれぞれコードされている。 $\alpha$ -MII を欠損してもほとんどの種類の細胞で複合型 *N*-結合型糖鎖が正常に形成されるという報告から、申請者は、*MAN2A1* の SNP も同様に、ほとんどの細胞で *N*-結合型糖鎖に影響を与えない可能性が高いと考えた。そこで、 $\alpha$ -MII がマンノシダーゼ活性の大部分を担い、 $\alpha$ -MIIx の寄与が小さい細胞では SNP の影響が現れやすいと考え、まず始めにマウスの大腸に存在する種々の細胞における *Man2a1* 及び *Man2a2* の遺伝子発現を調べることにした。マウスの大腸から上皮細胞、T 細胞、B 細胞、T 細胞及び B 細胞以外の白血球、ストローマ細胞を採取し、qPCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、上皮細胞以外の種類の細胞は *Man2a1* と *Man2a2* を同程度発現するのに対して、上皮細胞では *Man2a2* と比べて *Man2a1* の発現が顕著に高かった。この結果は、大腸上皮細胞では  $\alpha$ -MIIx と比べて  $\alpha$ -MII の寄与が大きく、*MAN2A1* の SNP の影響が現れやすいことを示唆している。この知見に基づき、申請者は大腸上皮細胞に発現する  $\alpha$ -MII が UC において重要な役割を果たしていると考え、腸管上皮細胞 (intestinal epithelial cell: IEC) 特異的に  $\alpha$ -MII を欠損する  $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスを作製した。

$\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスの大腸上皮細胞で複合型 *N*-結合型糖鎖の形成が阻害されるか調べるために、複合型 *N*-結合型糖鎖と特異的に結合するレクチンを用いたレクチンブロットを行った。その結果、 $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスの大腸上皮細胞では複合型 *N*-結合型糖鎖が顕著に減少していた。この結果は、大腸上皮細胞では *Man2a2* の発現が低いために  $\alpha$ -MII の欠損を代償できなかったことを示唆している。以上の研究から、大腸上皮細胞が、 $\alpha$ -MII を欠損しても  $\alpha$ -MIIx による代償が起こらない新たな細胞種であることが明らかになった。

### $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスは DSS 誘導性大腸炎に耐性を示す

IEC に発現する  $\alpha$ -MII の腸管炎症における役割を明らかにするために、申請者は  $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスの DSS 誘導性大腸炎に対する感受性を調べた。DSS を投与することにより体重減少や、下痢、血便といった UC 様症状が観察されたが、これらの症状を  $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスと対照マウスで比較したところ、 $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスで軽度であった。これらの臨床症状に加え、 $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスでは DSS 誘導性大腸炎に伴う大腸の短縮、大腸における組織学的変化が抑制されており、また炎症性サイトカインの発現も有意に低かった。これらの結果は IEC に発現する  $\alpha$ -MII が腸管炎症を促進することを示している。

### $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスではケモカインの産生が低下し、好中球の浸潤が抑制される

$\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスが DSS 誘導性大腸炎に耐性を示すメカニズムを明らかにするために、

申請者は大腸粘膜固有層（cLP）に存在する免疫系細胞をフローサイトメトリーによって解析した。α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスと対照マウスを比較すると、解析対象とした免疫系細胞のほとんどで違いは見られなかったが、好中球だけが特異的に α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスで減少していた。好中球は病原微生物を排除する働きを持つ一方、過剰な好中球の浸潤は組織傷害の原因にもなる。cLP に存在する好中球の数と大腸長（炎症のマーカーであり、炎症が重篤なほど短くなる）の相関を調べたところ、好中球数と大腸長は負の相関を示した。すなわち、cLP に存在する好中球が多いマウスほど大腸でより強い炎症が起きていることが分かった。以上のことから、IEC に発現する α-MII は好中球を大腸へとリクルートする働きを持っており、α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスでは好中球の浸潤が抑制されることで、DSS 誘導性大腸炎が軽減されたと考えられる。

好中球は C-X-C ケモカイン受容体 2（CXCR2）を発現しており、そのリガンドとなるケモカイン（CXCL1, CXCL2, CXCL5）を感知して、血液中から組織へと遊走する。α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスの cLP で好中球が少ない原因が大腸組織におけるケモカインの産生抑制にある可能性を考え、α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウス及び対照マウスの大腸組織における *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5* の遺伝子発現を解析した。その結果、α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスでは対照マウスと比較して大腸組織におけるこれらケモカインの遺伝子発現がいずれも顕著に低かった。これらのケモカインは様々な細胞で産生されるが、上皮細胞も産生細胞の 1 つとして知られている。α-MII を欠損した大腸上皮細胞ではこれらのケモカインの産生能が低下している可能性を考え、α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウス及び対照マウスの大腸上皮細胞を qPCR で解析した。その結果、大腸上皮細胞におけるケモカインの遺伝子発現は組織全体（上皮細胞とそれ以外の細胞の両方を含む）と比較して低く、また α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスと対照マウスの間で有意な差は見られなかった。この結果は、本モデルにおけるケモカインの主要な産生源は大腸上皮細胞以外の細胞であり、IEC に発現する α-MII はその細胞でのケモカインの産生を促進する働きをしている可能性を示している。

以上をまとめると、IEC 由来のケモカイン誘導因子が、大腸に存在する他の細胞（免疫系細胞、ストローマ細胞）に作用し、その細胞におけるケモカイン（CXCL1, CXCL2, CXCL5）の産生を促進すると考えられる。これらのケモカインは好中球に発現する CXCR2 に結合し、好中球の大腸への浸潤が促進される。大腸に過剰に集積した好中球が組織傷害を引き起こし、その結果として DSS 誘導性大腸炎が増悪すると考えられる。α-MII<sup>ΔIEC</sup> マウスでは IEC 由来ケモカイン誘導因子の発現や機能が低下することで、ケモカインの産生、好中球の浸潤が抑制され、DSS 誘導性大腸炎が軽減された可能性がある。

## 【結論】

本研究により、IEC に発現する α-MII が腸管炎症に促進的な役割を持つことが明らかになった。また、そのメカニズムとして、IEC 以外の細胞における好中球走化ケモカインの産生を促進することで、好中球の大腸への浸潤を間接的に制御していることが示

唆された。以上の実験結果に加え、*MAN2A1* の遺伝子領域に UC と相関を示す SNP が存在することから、*MAN2A1* は UC の発症に寄与する新たな感受性遺伝子と考えられる。

## 論文審査結果の要旨

IBD は世界的に患者数が増加している原因不明の難病であるが、遺伝的要因が発症に寄与すること、異常な免疫反応が起きていることが分かってきた。糖鎖は第3の生命鎖と呼ばれ、近年注目を浴びているが、その構造の多様性や複雑さから未解明な部分も多い。近年の研究により糖鎖の様々な疾患への関与や種々の免疫反応における重要性が分かってきた。IBD 患者では糖鎖の構造が変化することが報告されているが、病態への関与や構造変化の原因はよく分かっていない。IBD 患者の SNP 解析により、UC 感受性遺伝子の候補として *MAN2A1* が同定されたことを背景として、本論文において申請者は、UC の動物モデルである DSS 誘導性大腸炎を用いて  $\alpha$ -MII の病態生理学的役割を実験的に検証した。申請者は、コンディショナルノックアウトマウスの解析を通して、腸管上皮細胞に発現する  $\alpha$ -MII が腸管炎症を促進する働きを持つことを明らかにした。

申請者はまず、 $\alpha$ -MII を欠損してもそのアイソザイムである  $\alpha$ -MIIx の働きにより、ほとんどの種類の細胞で糖鎖が正常に形成されるという報告に着目し、これらの酵素の大腸における発現分布を解析した。その結果、大腸上皮細胞で  $\alpha$ -MIIx の発現が低いことを見出し、申請者は腸管上皮細胞特異的に  $\alpha$ -MII を欠損するコンディショナルノックアウトマウス ( $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウス) を作製した。 $\alpha$ -MII を欠損した大腸上皮細胞では糖鎖の成熟が阻害されており、大腸上皮細胞が  $\alpha$ -MIIx による代償が起らないユニークな細胞であることが明らかになった。さらに申請者は  $\alpha$ -MII<sup>ΔIEC</sup> マウスが DSS 誘導性大腸炎に対して耐性を示すこと、すなわち、腸管上皮細胞に発現する  $\alpha$ -MII が腸管炎症を促進することを明らかにした。また、そのメカニズムとして  $\alpha$ -MII が大腸に存在する非上皮系細胞におけるケモカイン産生を促進し、好中球の大腸への浸潤を促進する可能性を示唆した。IBD の遺伝的要因は盛んに研究が行われているものの、その大部分は未解明である。本研究は、*MAN2A1* 遺伝子の SNP が UC と相関を示すこと、またその遺伝子産物である  $\alpha$ -MII が実際に腸管炎症に影響を与えることを明らかにした重要な研究と言える。

口頭発表に対し、副査の三澤教授から「全身で  $\alpha$ -MII を欠損したマウスのフェノタイプ」について質問があり、申請者は「全身でノックアウトした場合、赤血球系細胞と腎細胞でも  $\alpha$ -MIIx による代償が起らず、貧血や糸球体腎炎が起きてしまう。」と返答した上で「腸管上皮細胞以外に発現する  $\alpha$ -MII が疾患に関与する可能性は否定できない。」と続けた。また副査の齋藤准教授からは「大腸よりも小腸で Villin の発現は高いが、小腸における  $\alpha$ -MII の欠損は関与しないのか。」との指摘があり、申請者は「大腸でもリ

コンビネーションに十分な *Villin* が発現している。」と説明した上で「確かに小腸上皮細胞でも  $\alpha$ -MII の欠損は起きており、その可能性は否定できない。しかし潰瘍性大腸炎や DSS 誘導性大腸炎においては炎症が大腸に局限しており、大腸上皮細胞に発現する  $\alpha$ -MII が重要ではないか。」と返答した。また「潰瘍性大腸炎患者における糖鎖構造の変化」について質問があり、申請者は先行研究を引用し「潰瘍性大腸炎患者の血清では複合型 N-結合型糖鎖が増加しており、中でも分岐した構造を持ち多くのシアル酸を有する糖鎖は疾患の活動性と相関する」と返答した。

申請者の博士論文、発表会での発表、試問に対する回答はおおむね妥当であり、腸管上皮細胞に発現する  $\alpha$ -MII の潰瘍性大腸炎における役割を独自の手法により提案した本研究は学術的に大きな価値があり、博士（薬学）を授与するにふさわしい学力を有すると判断した。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

Suzuki K., Yamada T., Yamazaki K., Hirota M., Ishihara N., Sakamoto M., Takahashi D., Iijima H., Hase K., Intestinal epithelial cell-specific deletion of  $\alpha$ -mannosidase II ameliorates experimental colitis. *Cell Struct. Funct.* (doi: 10.1247/csf.17022.)

### 【参考論文】

1. Hoshino T., Suzuki K., Matsushima T., Yamakawa N., Suzuki T., Mizushima T., Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by geranylgeranylacetone in mice. *PLOS ONE* 8(10), e76306, 2013
2. Yamakawa N., Suzuki K. (co-first author), Yamashita Y., Katsu T., Hanaya K., Shoji M., Sugai T., Mizushima T., Structure-activity relationship of celecoxib and rofecoxib for the membrane permeabilizing activity. *Bioorg. Med. Chem.* 22(8), 2529-2534, 2014
3. Aimi T., Suzuki K., Hoshino T., Mizushima T., Dextran sulfate sodium inhibits amyloid- $\beta$  oligomer binding to cellular prion protein. *J. Neurochem.* 134(4), 611-617, 2015
4. Suzuki K., Aimi T., Ishihara T., Mizushima T., Identification of approved drugs that inhibit the binding of amyloid  $\beta$  oligomers to ephrin type-B receptor 2. *FEBS Open Bio* 6(5), 461-468, 2016